



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
Potencial de los líquenes frente al cáncer

**Autor:** Laura Ruiz García-Mascaraque

**Fecha:** Junio 2019

**Tutor:** Ana Pintado Valverde

## Resumen

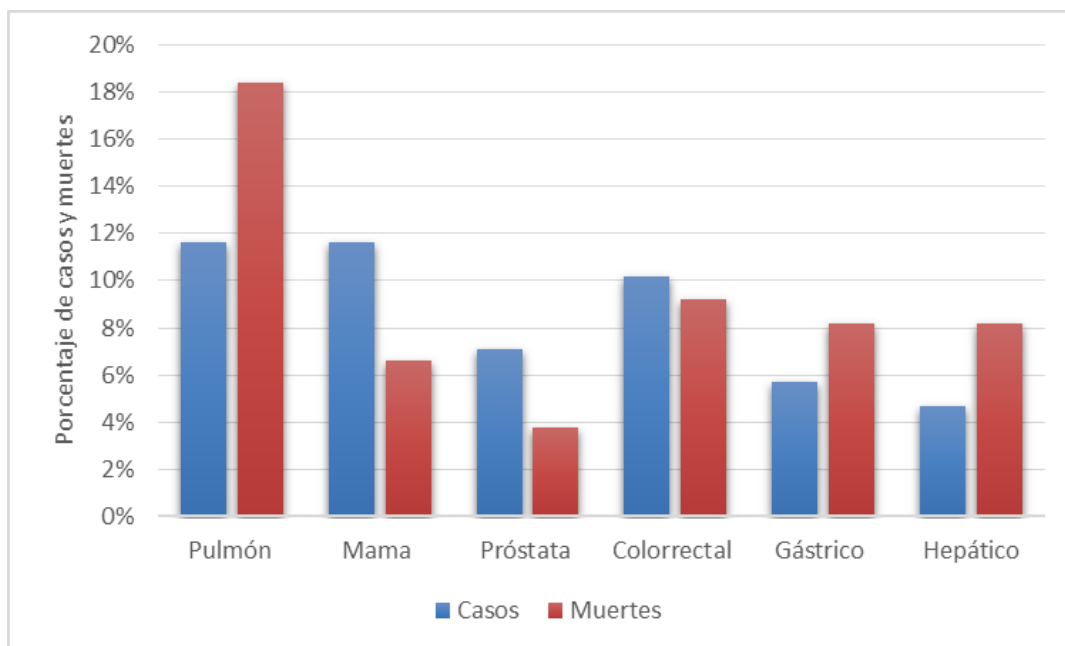
Los líquenes son asociaciones simbióticas entre un hongo (el micobionte) y, al menos, un organismo fotosintético (fotobionte), que puede ser un alga o una cianobacteria. Como resultado de la simbiosis producen una amplia variedad de metabolitos secundarios (compuestos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos y terpénicos) que son únicos. Los líquenes presentan una amplia distribución en la naturaleza y son capaces de crecer en regiones en las que no podrían crecer los simbiosiontes por separado. Los metabolitos secundarios ayudan a los líquenes a protegerse de las condiciones ambientales adversas y se ha demostrado que estos metabolitos presentan un amplio espectro de actividades biológicas, incluida la actividad antitumoral. Algunos de los mecanismos moleculares por los que los metabolitos secundarios ejercen actividad citotóxica son la regulación del ciclo celular, la inducción de la muerte celular apoptótica, la modulación del sistema inmune y la inhibición de la angiogénesis. El ácido úsnico es el metabolito secundario de los líquenes más estudiado. Una de las principales limitaciones del uso de los líquenes en la medicina moderna es su lenta tasa de crecimiento en la naturaleza. Además, es complicado mantener la simbiosis *in vitro*. En este trabajo se estudian algunos metabolitos secundarios que han demostrado actividad antitumoral y las posibles formas de obtenerlos a gran escala, así como los factores que influyen en su producción.

**Palabras clave:** líquenes, cáncer, potencial biofarmacéutico, simbiosis, metabolitos secundarios, cultivo.

## Introducción

El término “**cáncer**” incluye neoformaciones malignas que se producen en células derivadas del tejido epitelial (carcinomas), del tejido conectivo (sarcomas), de las células de la glía (glioblastomas) y de los tejidos hematopoyéticos (leucemias y linfomas). El cáncer engloba una serie de enfermedades que presentan diferentes factores de riesgo, distintas localizaciones, cuadros clínicos propios, evolución y pronósticos diversos, pero que tienen en común, en mayor o menor grado, una serie de características biológicas. Desde un punto de vista biológico, las células cancerosas de los diferentes tumores presentan en común un crecimiento incontrolado, pérdida de la diferenciación y capacidad de extenderse a los tejidos adyacentes (invasión) y migrar a órganos distantes (metástasis) [1].

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. El impacto del cáncer sigue aumentando en gran medida debido al envejecimiento y al crecimiento de la población mundial junto con una creciente adopción de conductas causantes de cáncer (tabaco, infecciones, alcohol, dieta, contaminación, etc). Los tipos de cáncer con mayor incidencia son el cáncer de pulmón, mama, próstata y colorrectal. Los tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son el cáncer de pulmón, colorrectal, estómago e hígado (*Figura 1*). La incidencia y la mortalidad varían entre hombres y mujeres. En hombres, el cáncer de pulmón, próstata y colorrectal son los más diagnosticados, mientras que en las mujeres son el cáncer de mama, colorrectal y pulmonar. Los tipos de cáncer que causan mayor número de fallecimientos en hombres son el cáncer de pulmón, hepático y gástrico y en las mujeres el cáncer de mama, pulmonar y colorrectal. Sin embargo, el cáncer que se diagnostica con mayor frecuencia y la causa principal de muerte por cáncer varía de un país a otro, según el grado de desarrollo económico y los factores sociales y de estilo de vida asociados [2].



	<b>Pulmón</b>	<b>Mama</b>	<b>Próstata</b>	<b>Colorrectal</b>	<b>Gástrico</b>	<b>Hepático</b>
<b>Casos</b>	11,60%	11,60%	7,10%	10,20%	5,70%	4,70%
<b>Muertes</b>	18,40%	6,60%	3,80%	9,20%	8,20%	8,20%

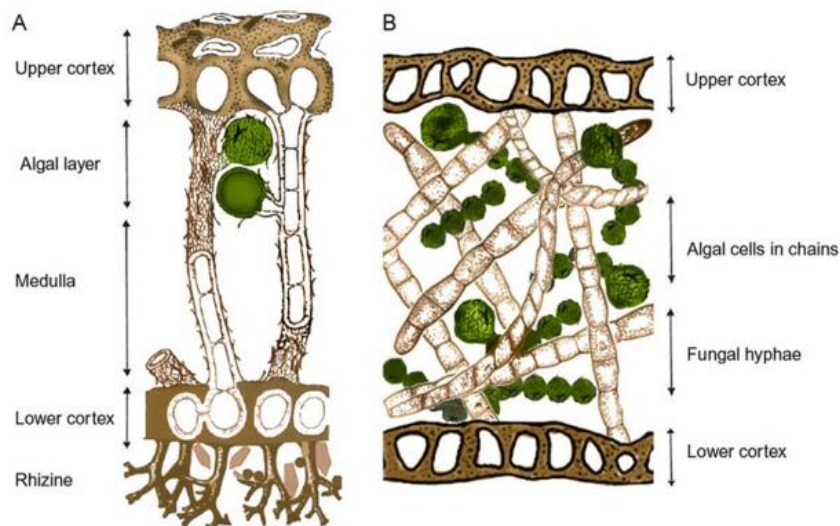
*Figura 1. Distribución de casos y muertes para los tipos de cáncer más comunes en todo el mundo en 2018. Datos obtenidos de Bray et al. (2018) [2].*

Actualmente, el cáncer se puede tratar mediante la erradicación de las células cancerosas a través de uno o más métodos, como son la cirugía, radioterapia, quimioterapia y/o terapia dirigida. Entre estos, la quimioterapia utiliza compuestos químicos que ejercen citotoxicidad en las células neoplásicas. Sin embargo, estos efectos no son específicos para las células neoplásicas y su administración generalmente provoca efectos secundarios no deseados. Por ello, se han desarrollado enfoques terapéuticos dirigidos con menos efectos secundarios. Las moléculas pequeñas y los anticuerpos se aplican generalmente para la terapia dirigida y se ha visto que los productos de los líquenes son una fuente prometedora para estas moléculas pequeñas [3].

Los líquenes se han utilizado desde la antigüedad con diversos fines, en particular como tintes, fijadores en perfumes, bioindicadores de contaminación del aire y remedios medicinales. En la medicina popular europea, se ha utilizado el líquen *Cetraria islandica* L. para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, en comparación con otros productos naturales, las actividades biológicas de los líquenes han sido poco estudiadas. En las últimas décadas, ha aumentado el interés por los líquenes como fuente de biomoléculas novedosas, farmacológicamente activas. Muchos países han desarrollado productos farmacológicos comerciales basados en metabolitos secundarios de los líquenes [4, 5].

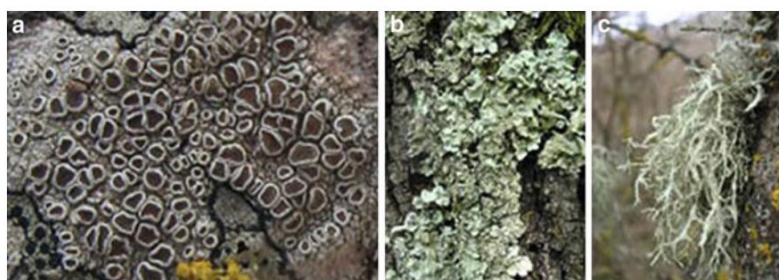
Los líquenes se definen generalmente como organismos simbióticos que resultan de la asociación exitosa entre un hongo (micobionte) y una pareja fotosintética (fotobionte), que en la mayoría de los casos se trata de algas verdes, pero también pueden ser cianobacterias (10%) o una asociación simultánea de algas y cianobacterias (3-4%) [6]. Cerca del 98% de los hongos presentes en los líquenes son ascomicetos, y el 2% restante son basidiomicetos y

hongos anamorfos. Al menos, 23 géneros de algas y 15 géneros de cianobacterias se dan en los líquenes. La morfología del talo liquénico está determinada principalmente por el micobionte. Generalmente, el talo consiste en varias capas (corteza superior e inferior, capa algal y médula) que difieren en espesor y están mejor desarrolladas en unas especies que en otras. A este tipo de talo se le denomina heterómero. Sin embargo, algunos líquenes no forman un talo bien organizado, sino que las hifas fúngicas crecen dentro de las vainas gelatinosas del fotobionte (talo homómero) (Figura 2) [7, 8, 9].



*Figura 2. Organización de un talo heterómero (A) y un talo homómero (B). Imagen tomada de Varol (2018) [9].*

Hay tres tipos principales de morfología de talo: crustoso, folioso y fruticuloso (Figura 3) [7]. La relación entre los organismos que constituyen el cuerpo liquénico o talo es tan íntima, que se comportan como una entidad única y diferente (morfológica, fisiológica y bioquímicamente) a los organismos independientes [6].



*Figura 3. Principales tipos de talo. (a) Crustoso; (b) Folioso; (c) Fruticuloso. Imagen tomada de Ranković & Kosanić (2015) [7].*

Los líquenes se encuentran en casi todos los hábitats terrestres desde los trópicos hasta las regiones polares siendo la vegetación dominante en muchos ambientes extremos. Como resultado de la simbiosis, tanto el fotobionte como el micobionte se han expandido en muchos hábitats (tundra ártica y antártica, desiertos cálidos, costas rocosas, etc.). Los distintos colores de los líquenes se deben a la acumulación de diversos metabolitos secundarios. Estas sustancias son compuestos que ayudan al organismo a defenderse y a crecer en condiciones

ambientales muy adversas (radiación solar y temperaturas extremas, desecación, inundaciones, etc.). Sin embargo, los líquenes son muy sensibles a los óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>) y nitrógeno (NO<sub>x</sub>) y al ozono, y además tienen capacidad para absorber/acumular metales pesados y radionúclidos, lo que los ha convertido en valiosos indicadores de contaminación en los sitios urbanos e industriales del mundo [6, 10].

Las condiciones específicas en las que viven los líquenes son el motivo de la producción de muchos metabolitos que proporcionan una buena protección frente a factores físicos y biológicos adversos. Los metabolitos sintetizados por los líquenes pueden ser: metabolitos primarios (intracelulares), que son inespecíficos y suelen ser solubles en agua, o metabolitos secundarios (extracelulares), que son específicos y suelen ser insolubles en agua y se pueden extraer con disolventes orgánicos. La producción de estos metabolitos secundarios, conocidos como “sustancias líquénicas” es resultado de la simbiosis y exclusiva de los líquenes. La mayoría de estos son producidos por el micobionte. A nivel histológico, los metabolitos secundarios del liquen se depositan en la corteza (ácido úsnico, parietina, atranorina, ácido pulvínico) o, más comúnmente, en la médula (ácido fisódico, ácido fisodálico, ácido protocetrárico). Su biosíntesis es compleja y está influenciada por factores ambientales como la luz, la temperatura, la altura, la estacionalidad, etc. Las principales rutas por las que se sintetizan son la vía del acetyl-polimalonil, la vía del ácido shikimico y la vía del ácido mevalónico (Figura 4), siendo de mayor interés los compuestos derivados de la vía del acetyl-polimalonil tales como depsidos, depsidonas, dibenzofuranos, xantonas y antraquinonas [7, 10, 11, 12].

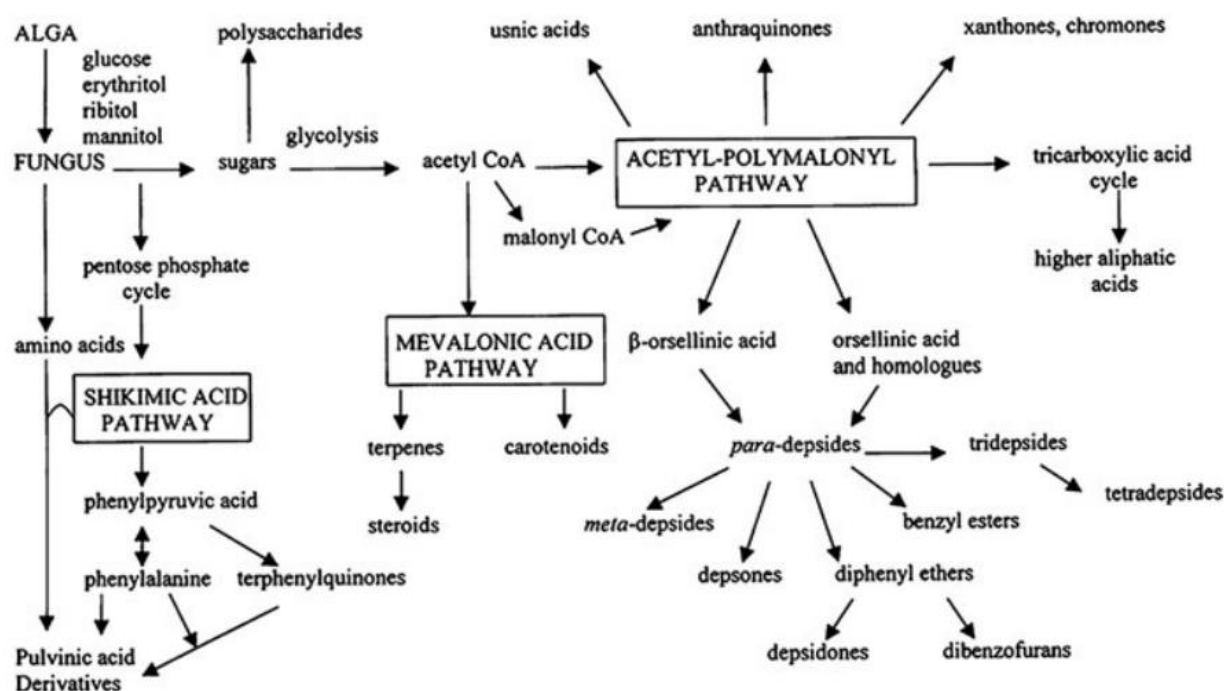
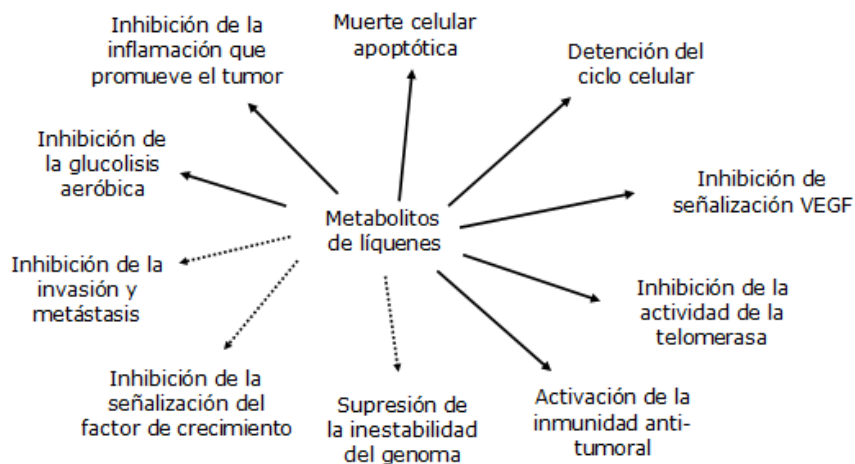


Figura 4. Rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios de líquenes. Figura tomada de Elix & Stocker-Wörgötter (2008) [11].

Hasta la fecha, muchos líquenes y productos de líquenes han demostrado ser una fuente de metabolitos secundarios importantes para la industria farmacéutica. Estos muestran un amplio espectro de actividades biológicas como antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios,

citotóxicos, analgésicos, antipiréticos, antivirales, etc. Algunos pueden provocar citotoxicidad inhibiendo la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular o por inducción de la apoptosis, por lo que podrían ser empleados como anticancerígenos. También pueden modular la actividad del sistema inmune, la angiogénesis o el metabolismo energético (Figura 5).



*Figura 5. Ilustración esquemática de los posibles mecanismos anticancerígenos de los metabolitos secundarios de los líquenes. Las líneas continuas indican que se encontraron estudios que informaron el mecanismo. Las líneas de puntos indican que no se encontraron estudios que informaran el mecanismo. Figura modificada de Kim et al. (2015) [3].*

A pesar del potencial de los líquenes, la industria farmacéutica los ha pasado por alto debido a su lenta tasa de crecimiento en la naturaleza (mm/año) y a las dificultades en su cultivo *in vitro*. En la actualidad, existe un interés creciente en las propiedades farmacéuticas de los compuestos derivados de los líquenes [13]. Sin embargo, son relativamente pocas las sustancias que se han evaluado en detalle para determinar su actividad biológica y su potencial terapéutico, debido principalmente a las dificultades para obtenerlas en cantidad y pureza suficientes para la elucidación estructural y las pruebas farmacológicas [3, 7].

## Objetivos

El objetivo general del trabajo es conocer el potencial de los líquenes frente al cáncer. Los objetivos específicos son:

- Revisión de metabolitos secundarios derivados de los líquenes con posible aplicación frente al cáncer.
- Conocer en qué condiciones se producen estos metabolitos secundarios.
- Valorar opciones de cultivo de los líquenes o de sus simbioses debido a la complejidad de mantener la simbiosis *in vitro*, y otras alternativas.

## Metodología

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos científicos, libros y páginas web institucionales. Para ello se ha empleado “Google Académico”, “PubMed” y “Science Direct”. Para la búsqueda se han empleado las palabras clave: lichens, pharmaceutical potential, anticancer activity, secondary metabolites and cancer.

## Resultados y discusión

Como resultado de la simbiosis y de los ambientes en los que habitan, los líquenes producen metabolitos secundarios que presentan un amplio espectro de actividades biológicas (antimicrobianos, antifúngicos, antitumorales, antioxidantes, antivirales, etc.). Estos metabolitos son exclusivos de los líquenes y rara vez se dan en hongos o en plantas. Actúan como mecanismo de defensa frente a determinadas situaciones y su potencial puede ser investigado y utilizado para diversas aplicaciones farmacéuticas. Se ha visto que entre estas actividades biológicas se encuentran las actividades anticancerígena y antioxidante, que pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer, el cual constituye un problema de salud a nivel mundial. Algunos metabolitos son fuertemente citotóxicos y tienen la capacidad de inhibir la proliferación celular a bajas concentraciones [3, 14].

### Mecanismos anticancerígenos

Se han propuesto varios mecanismos anticancerígenos a partir de varios estudios de los metabolitos secundarios de los líquenes [1, 3, 14]:

- **Inducción de la muerte celular apoptótica.** Una de las características biológicas del cáncer es la capacidad de evitar la muerte celular programada (apoptosis). La apoptosis puede ser desencadenada por factores externos a la célula a través del receptor del ligando Fas, o por factores internos, mediados por proteínas de la familia Bcl-2.
- **Regulación del ciclo celular.** Es fundamental para controlar el crecimiento y el desarrollo de células cancerosas. Se han encontrado varios metabolitos derivados de líquenes que detienen el crecimiento de células cancerosas en la fase sub-G1 o S del ciclo celular.
- **Inhibición de la señalización del VEGF** (factor de crecimiento del endotelio vascular). El VEGF es una proteína implicada en la angiogénesis.
- **Inhibición de la actividad de la telomerasa.** La telomerasa es una enzima que ayuda a las células a mantenerse vivas al agregar ADN a los telómeros (extremos de los cromosomas). Habitualmente, las células cancerosas tienen más telomerasa que la mayoría de las células normales.
- **Activación de la inmunidad antitumoral.**
- **Inhibición de la glucólisis aeróbica.** Está demostrado que las células tumorales presentan un metabolismo de glucosa anómalo. En condiciones aeróbicas el piruvato no se dirige hacia la mitocondria para producir ATP, sino que se transforma en lactato (efecto Warburg). Este proceso permite que los productos intermediarios de la glucólisis se utilicen en circuitos biosintéticos que facilitan la generación de macromoléculas necesarias para mantener la elevada replicación celular.
- **Inhibición de la inflamación que produce el tumor.** La inflamación facilita la tumorigénesis y la progresión tumoral al aportar moléculas bioactivas que incluyen

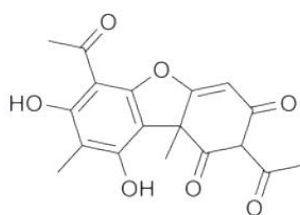


factores de crecimiento, inhibidores de muerte celular, factores proangiogénicos, modificadores de la matriz extracelular que facilitan la invasión y metástasis, etc.

La mayoría de los estudios se han centrado en revelar la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios. Los mecanismos moleculares por los que los metabolitos pueden tener actividad citotóxica son la detención del ciclo celular y la inducción de la muerte celular apoptótica (vía extrínseca e intrínseca). Los metabolitos de los líquenes también pueden ejercer efectos contra el cáncer regulando la inflamación que promueve el tumor y/o la inmunidad antitumoral, aunque la mayoría de los mecanismos subyacentes a estos efectos aún no se han definido. La angiogénesis es esencial para el desarrollo del cáncer, especialmente para la proliferación y diseminación metastásica de las células cancerosas. Las conductas malignas de cáncer que más amenazan la vida son la invasión y la metástasis. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que muestren actividad inhibitoria contra la motilidad de las células cancerosas a partir de productos de líquenes [1, 3, 14].

### Metabolitos secundarios derivados de líquenes con actividad anticancerígena

- **ÁCIDO ÚSNICO** (*Figura 6*). Es el metabolito secundario más estudiado y conocido de los líquenes, producido en la corteza superior de muchas especies de familias filogenéticamente muy separadas. Se sintetiza a través de la vía del acetyl-polimalonil, la cual utiliza Acetyl-CoA y Malonil-CoA (*Figura 4*). Una de sus principales funciones en los líquenes es absorber los rayos UV y proteger la capa algal de la radiación intensa. Su interés deriva de su amplio espectro de actividades biológicas.



*Figura 6. Estructura del ácido úsnico (Usnea sp.). Figura tomada de Goga et al. (2018) [15].*

Se ha visto que el ácido úsnico inhibe la proliferación celular en el **cáncer de pulmón (A549)** al detener el ciclo celular en la fase G0/G1 (mediante la alteración de la ciclina D1, las quinasas dependientes de ciclina y los niveles de expresión de la proteína inhibidora de la quinasa dependiente de la ciclina) e induce la muerte celular apoptótica a través de la despolarización de la membrana mitocondrial. Además, el ácido úsnico, inhibe la entrada en fase S del ciclo celular de dos líneas celulares diferentes de cáncer humano: la línea celular de **cáncer de mama T-47D** y la línea celular de **cáncer de páncreas Capan-2**. Sin embargo, no se ha observado muerte celular apoptótica para estas líneas celulares y la necrosis solo se ha observado para las líneas celulares Capan-2. Otros estudios también han demostrado sus efectos citotóxicos frente a las líneas celulares **MCF-7 (mama)**, **HCT-116 (colon)** y **HeLa (cérnix)**. Tiene efecto antiproliferativo en células de **leucemia humana (K562)** y **carcinoma de endometrio (Ishikawa, HEC-50)**.



Además, el ácido úsnico presenta efectos antiinflamatorios mediante la inhibición del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y la expresión de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) a través de la regulación de la actividad de señalización del factor nuclear (NF- $\kappa$ B) al suprimir la degradación de I- $\kappa$ B. También presenta actividad anti-angiogénica. En las células endoteliales, el ácido úsnico bloquea el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2). Para el ácido úsnico, las alteraciones en la formación y/o estabilización de los microtúbulos no son responsables de las actividades antimitóticas y antiproliferativas [4, 3, 7].

- **ATRANORINA** (Figura 7). Es un depsido que está presente en muchas familias de líquenes como *Cladoniaceae*, *Lecanoraceae*, *Parmeliaceae* y *Streocaulaceae*. Se sintetiza a través de la vía del acetil-polimalonil (Figura 4). Tiene fuertes propiedades antioxidantes y antitumorales. Es una de las sustancias liquénicas que mayor capacidad tiene para eliminar radicales libres. En estudios realizados, se observó como el ácido úsnico y la atranorina indujeron una pérdida en el potencial de la membrana mitocondrial, junto con la activación de la caspasa-3 en las células **HT-29** de **cáncer de colon**. Además, activaron la muerte celular programada tanto en **HT-29** como en **A2780** (**cáncer de ovario humano**), probablemente a través de la vía mitocondrial. También se ha visto que la atranorina, el ácido difractaico y el ácido divaricático son activos contra las líneas celulares **LNCaP** (**cáncer de próstata con respuesta a andrógenos**) y **DU-145** (**cáncer de próstata sin respuesta a andrógenos**) [14, 15, 16].

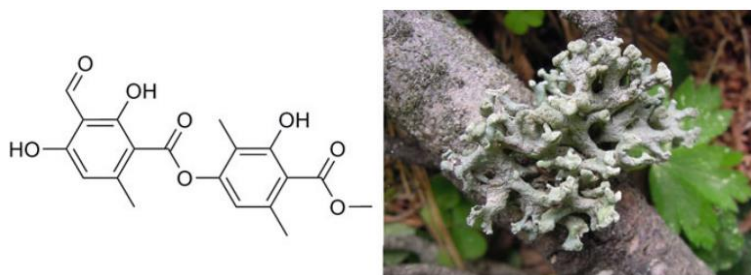
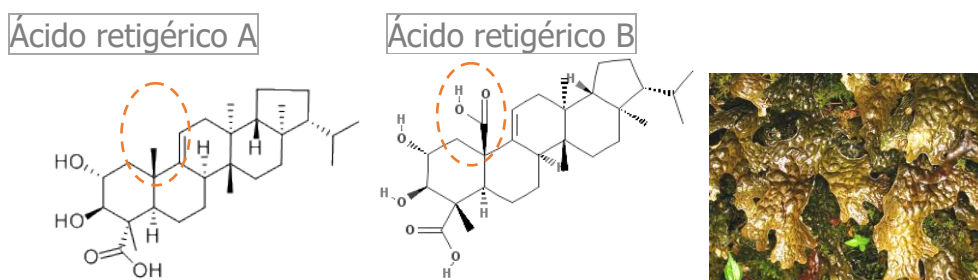


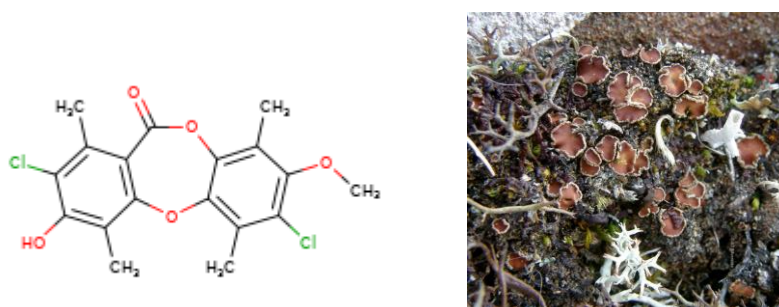
Figura 7. Estructura de la atranorina (*Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav.). Figura tomada de Goga et al. (2018) [15].

- **ÁCIDO RETIGÉRICO** (Figura 8). Tanto el ácido retigérico A como el ácido retigérico B del líquen *Lobaria kurokawae* han mostrado citotoxicidad a bajas concentraciones, pero el B es más potente que el A. El análisis estructural del ácido retigérico A y B ha demostrado que una cadena lateral de metilo de A está sustituida con un -COOH en B, lo que sugiere una posible relación estructura-actividad. El ácido retigérico B promueve la detención de la fase S en células de **cáncer de próstata** independientes de andrógenos (**PC-3**) con aumento de los niveles de p21, ciclina E, ciclina A y proteína de retinoblastoma fosforilada (pRb) y disminución de los niveles de ciclina B. También se ha visto que el ácido retigérico B induce la muerte celular apoptótica mediada por la vía intrínseca a través de cambios en las proteínas Bax/Bcl-2 e induce la muerte celular apoptótica dependiente e independiente de caspasa [3, 14]. En un reciente estudio, se evaluó la función del ácido retigérico B combinado con fármacos quimioterapéuticos clínicos en líneas celulares de cáncer de próstata y se vio que el ácido retigérico B a dosis bajas produjo una citotoxicidad sinérgica significativa en combinación con cisplatino; sin embargo, no se observó una sinergia marcada entre el ácido retigérico B y los otros agentes quimioterapéuticos [17].

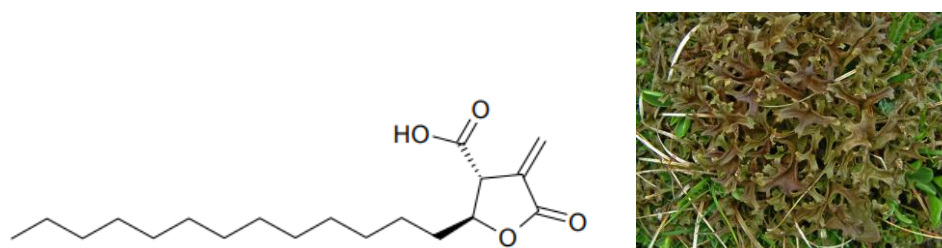


**Figura 8.** Estructura del ácido retigérico A y B (*Lobaria kurokawae* Yoshim). Figuras tomadas de [www.bocsci.com](http://www.bocsci.com); [aac.asm.org](http://aac.asm.org); [lichenportal.org](http://lichenportal.org)

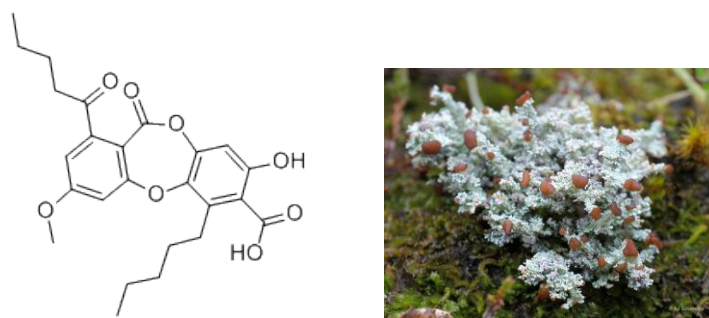
• **VICANICINA** (Figura 9), **ÁCIDO PROTOLIQUESTERÉNICO** (Figura 10) y **ÁCIDO LOBÁRICO** (Figura 11). La vicanicina y el ácido protoliquestérico son activos contra las líneas celulares **LNCaP** y **DU-145** de **cáncer de próstata**. Su respuesta es dependiente de la dosis. Aumentan la expresión del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) en células de cáncer de próstata. Además, inducen la apoptosis a través de la inhibición de Hsp70, que es una chaperona que promueve la supervivencia celular en respuesta a las condiciones adversas. En contraste con las células normales, la mayoría de las células cancerosas expresan Hsp70. [3, 14, 18]. También se ha demostrado que el ácido protoliquestérico y el ácido lobárico ejercen efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la actividad de la 5-lipoxigenasa. Además, se ha visto que más metabolitos tienen actividad inhibitoria de las lipoxigenasas 5 y 12 y efectos antiproliferativos *in vitro* contra varias líneas celulares de cáncer humano y plaquetas humanas [3].



**Figura 9.** Estructura de la vicanicina (*Psoroma hypnorum* (Vahl) Gray). Figuras tomadas de [chem.nlm.nih.gov](http://chem.nlm.nih.gov); [www.lichens.lastdragon.org](http://www.lichens.lastdragon.org)

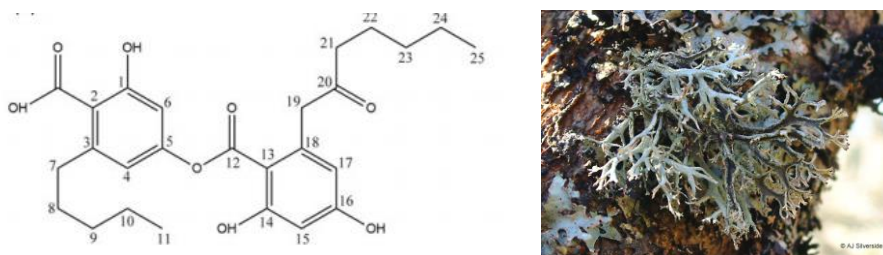


**Figura 10.** Estructura del ácido protoliquestérico (*Cetraria islandica* (L.) Ach.). Figuras tomadas de [www.chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com); [www.europeana.eu](http://www.europeana.eu)



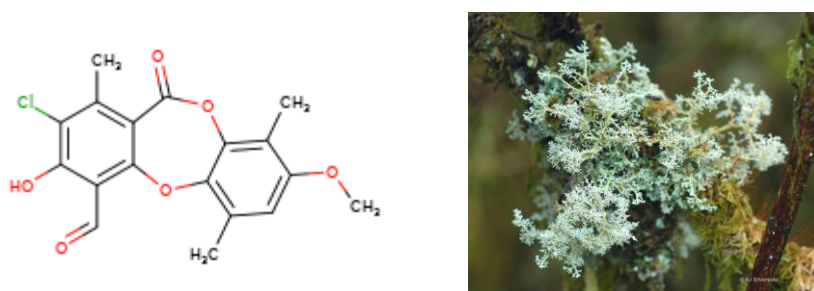
**Figura 11.** Estructura del ácido lobárico (depsidona) (*Stereocaulon dactylophyllum* Flörke). Figuras tomadas de [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net); [www.lichens.lastdragon.org](http://www.lichens.lastdragon.org)

- **ÁCIDO OLIVETÓRICO.** El ácido olivetórico, aislado del extracto de acetona de *Pseudevernia furfuracea*, ha mostrado potentes actividades antiangiogénicas dependientes de la dosis. En un estudio, el ácido olivetórico inhibió la proliferación de células endoteliales del tejido adiposo de rata (RATEC) e interrumpió la formación del tubo endotelial en esta célula, posiblemente a través de la desorganización del citoesqueleto de actina [3, 14].



**Figura 12.** Estructura del ácido olivetórico (*Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf). Figuras tomadas de [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net); [www.lichens.lastdragon.org](http://www.lichens.lastdragon.org)

- **PANARINA** (depsidona) (*Figura 13*). Se sintetiza a través de la vía del acetil-polimalonil. La actividad cancerígena es debida a la inhibición del crecimiento celular e inducción de la muerte celular apoptótica de las células **DU-145** en el **carcinoma de próstata** humano y de las células de **melanoma M14**. La muerte celular apoptótica es debida a la fragmentación del ADN y al aumento de la actividad de la caspasa 3 [4, 14, 19].



**Figura 13.** Estructura de la panarina (*Sphaerophorus globosus* (Huds.) Vain.). Figuras tomadas de [chem.nlm.nih.gov](http://chem.nlm.nih.gov); [www.lichens.lastdragon.org](http://www.lichens.lastdragon.org)

• **TENUIORINA** (tridepsido) (Figura 14) y **ORSELLINATO DE METILO** (Figura 15). Son derivados del orcinol, extraídos de *Peltigera leucophlebia*, que inhiben la proliferación celular en líneas celulares de **cáncer de mama (T-47D)**, **pancreático (PANC-1)** y **colon (WIDR)**. También, han mostrado actividad inhibitoria *in vitro* contra la 15-lipoxigenasa de la soja. [4].

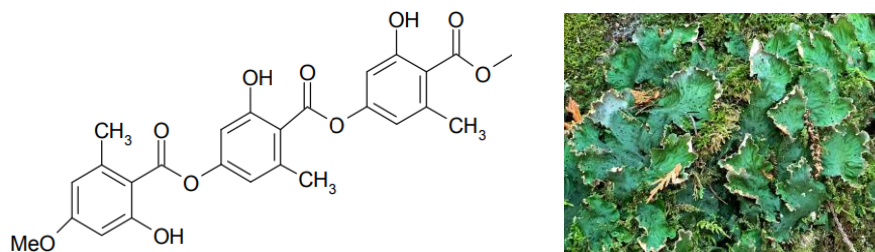


Figura 14. Estructura de la tenuiorina (*Peltigera leucophlebia* (Nyl.) Gyeln.). Figuras tomadas de [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov); [lichenportal.org](http://lichenportal.org)

• **ÁCIDO LECANÓRICO** (Figura 14). Es un metabolito secundario de numerosos líquenes, como por ejemplo *Parmotrema timctorum*, que ha demostrado tener actividades anticancerígenas contra el **carcinoma de laringe HEP-2**, el **carcinoma de mama MCF7**, el **carcinoma de riñón 786-0** y las líneas celulares de **melanoma murino B16-F10** [4, 15].

Algunas modificaciones estructurales en estos compuestos mejoran la actividad citotóxica. Además, la posición de los diferentes grupos funcionales en los compuestos de líquenes también afecta a los niveles de toxicidad. En un estudio se evaluó la actividad citotóxica del ácido lecanórico y los orsellinatos de metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, iso-propilo, sec-butilo, ter-butilo frente al carcinoma de laringe (HEp-2), carcinoma de mama (MCF7), carcinoma de riñón (786-0) y melanoma murino (B16-F10). De todos los compuestos que fueron evaluados, el orsellinato de n-butilo fue el más activo frente a las líneas celulares HEp-2, MCF7, 786-0 y B16-F10. Además, fue más activo que el cisplatino contra las células B16-F10. La actividad de los orsellinatos aumenta cuanto más larga es la cadena, esto podría explicarse por el aumento de la liposolubilidad de la molécula [14, 20].

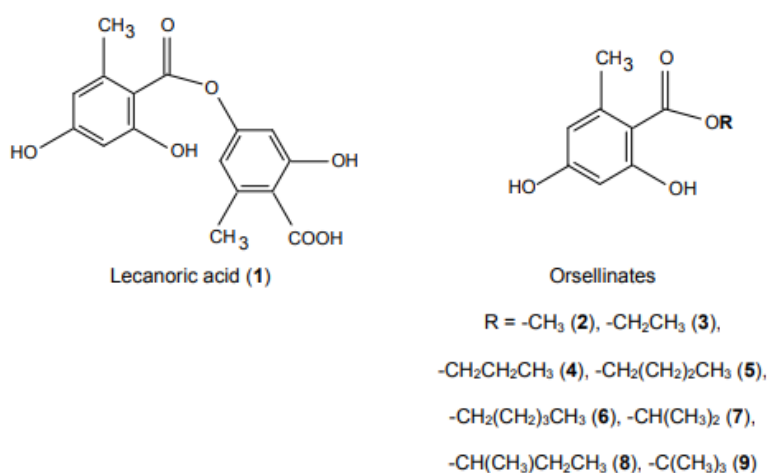
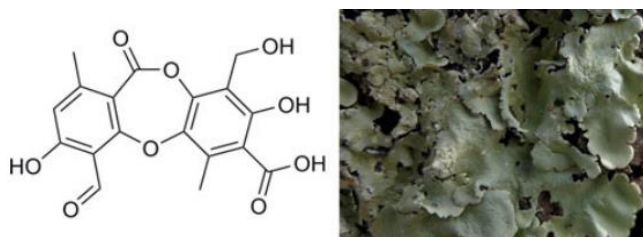


Figura 15. Estructuras del Ácido lecanórico (1), orsellinato de metilo (2), etilo (3), n-propilo (4), n-butilo (5), n-pentilo (6), iso-propilo (7), sec-butilo (8), ter-butilo (9). Figuras tomadas de Bogo et al. (2010) [20].



- **ÁCIDO PROTOCETRÁRICO** (Figura 16). Presenta actividad antiproliferativa contra las líneas celulares **FemX** (melanoma humano) y **LS174** (carcinoma de colon humano) [15].



*Figura 16. Estructura del ácido protocetrárico (Flavoparmelia caperata (L.) Hale). Figura tomada de Goga et al. (2018) [15].*

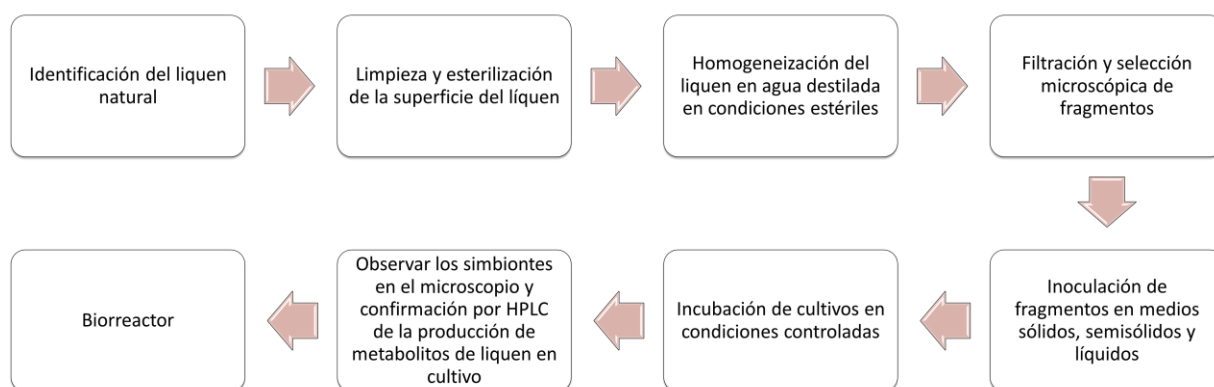
### Otros productos derivados de líquenes con actividad anticancerígena

- Tanto el **extracto de acetona** como el de **metanol** de *Lethariella zahlbruckneri* (Du Rietz) Krog disminuyen el número de células viables del cáncer de colon (HT-29) tanto de manera dependiente del tiempo como de la dosis, pero el de acetona ha mostrado mayor toxicidad. El **extracto de acetona** induce la muerte celular al aumentar la población celular en la fase sub-G1, así como la formación de cuerpos apoptóticos, mientras que estas actividades no se han observado en el extracto de metanol. La apoptosis es inducida de forma dependiente e independiente de caspasa. Es mediada por mitocondrias debido a que hay un aumento en el nivel de Bax y una disminución en el nivel de la proteína Bcl-2 [14].
- El **extracto de metanol** de *Caloplaca regalis* (Vain.) Zahlbr. induce la activación de macrófagos posiblemente mediado por la señalización MAPK p38. A través de la activación de los macrófagos, el extracto indujo actividad tumoricida contra células de melanoma B16 co-incubadas [3].
- Los extractos del líquen *Collema flaccidum* (Ach.) Ach, que contienen glucósidos de **bisantraquinona**, presentan actividad anticancerígena significativa frente al tumor de la vesícula biliar. Los extractos que contienen **depsidonas** muestran actividades anticancerígenas similares al inducir la muerte celular en las células DU-145 del carcinoma de próstata humano y la apoptosis celular en las células M14 del melanoma humano [4].
- El **polisacárido-2 (CFP-2)** de *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad induce la regulación positiva de la expresión de Fas y FasL en líneas celulares de leucemia promielocítica HL-60, reduciendo la viabilidad de estas células debido a la vía apoptótica, y disminuye la actividad de la telomerasa, lo que sugiere su posible potencial terapéutico contra el cáncer [3, 4]. Los polisacáridos derivados del líquen, incluidos el **liquenano**, el **pustulano**, el **Ths-2** y el **tamnolano**, ejercen efectos antiinflamatorios a través de la estimulación de la maduración de células dendríticas en la respuesta de tipo Th2 [3].

## **Cultivo de líquenes y sus simbios. Factores que promueven la producción de metabolitos.**

A pesar del amplio espectro de actividades biológicas mostradas por los líquenes, la industria farmacéutica los ha pasado por alto debido a su lento crecimiento en la naturaleza (milímetros por año) y a las dificultades en el cultivo *in vitro* de estos organismos. Para la explotación comercial de estas sustancias es necesaria una gran cantidad y la producción industrial a gran escala todavía no se ha logrado. En general, los cultivos de líquenes crecen mucho más rápido que el talo natural, pero de forma más lenta que muchos otros microorganismos. En condiciones naturales, la producción de metabolitos secundarios por los líquenes es compleja y está influenciada por factores ambientales, como la radiación solar, la exposición a los rayos UV, la altura, las fluctuaciones de la temperatura y la estacionalidad [7, 21].

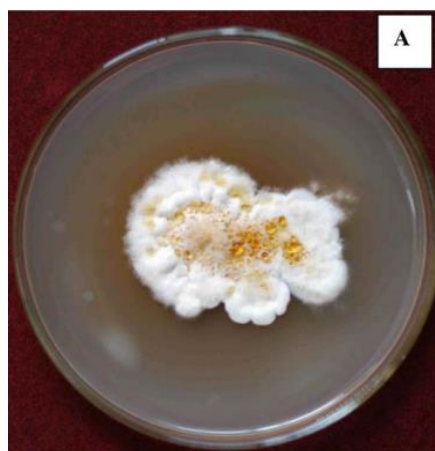
Una posible opción para aumentar la producción de metabolitos secundarios sería emplear la ingeniería genética para clonar enzimas que participan en la vía de los policétidos con el fin de producir altos rendimientos de metabolitos secundarios por medio de huéspedes sustitutos. Un requisito previo sería la expresión heteróloga de la policetido sintasa (PKS) funcional en los huéspedes. Sin embargo, los genes para la PKS fúngica son secuencias de ADN muy grandes que a menudo contienen secuencias de intrones. Por lo tanto, la clonación es muy difícil. Por ello, para prevenir el declive de la población de líquenes en su hábitat natural, la única alternativa concebible es su cultivo *in vitro* a partir de un espécimen natural. El procedimiento consiste en limpiar el talo líquénico con agua, homogeneizar en agua destilada en condiciones estériles, filtrar e inocular en medios de cultivo adecuados y en condiciones controladas. Tras el crecimiento se pueden observar los simbios por separado y se confirma por HPLC la producción de metabolitos secundarios. El biorreactor permite la producción en masa de metabolitos secundarios de líquenes en condiciones *in vitro* dentro de un lapso de tiempo menor (Figura 17). El cultivo *in vitro* de líquenes es, además, una herramienta esencial para investigar las rutas biosintéticas de los metabolitos de los líquenes, así como las condiciones necesarias para su producción [10, 21].



*Figura 17. Cultivo in vitro de líquenes. Esquema modificado de Verma & Behera (2015) [10].*

Diversas investigaciones han sugerido que la producción de metabolitos secundarios en los líquenes está influenciada por cambios en las condiciones de cultivo (temperatura, pH, humedad, medios nutritivos, etc) [10].

Behera et al. (2006) publicaron un estudio sobre experimentos realizados para conocer el crecimiento y la producción de ácido úsnico de *Usnea ghattensis* G. Awasthi *in vitro*. Los talos líquénicos fueron cultivados en medio agua-agar y medio con extracto de malta [21].



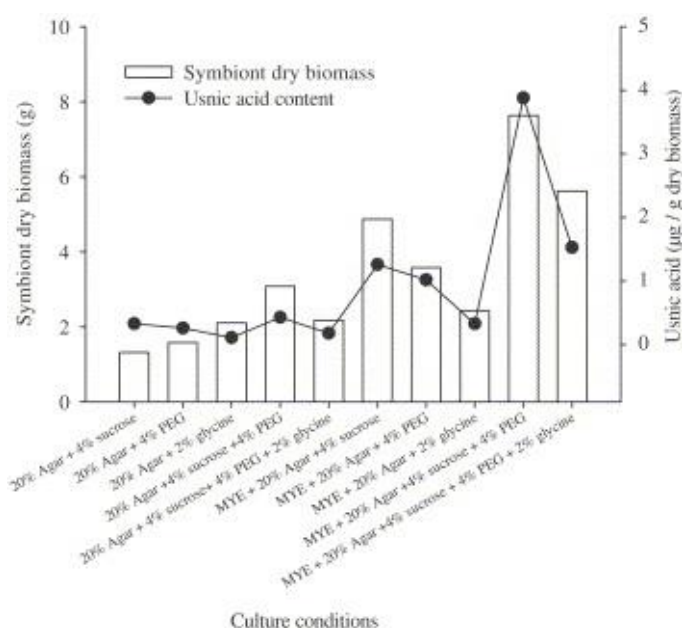
**Figura 18.** Cultivo obtenido del liquen *Usnea ghattensis* G. Awasthi cultivado en medio con extracto de malta con 4% sacarosa y 4% PEG. Fuente: Behera et al. (2006) [21].

Los resultados mostraron que en el medio agua-agar el crecimiento de los simbioses es más lento y se produce menos cantidad de ácido úsnico. Una concentración de agar en un 5%, promovió el crecimiento de los simbioses, pero no produjo ácido úsnico incluso después de 6 meses de inoculación. El incremento en un 10-20% de la concentración de agar promovió el crecimiento de los simbioses y la producción de ácido úsnico. Esto podría deberse a cambios en las condiciones osmóticas. En el medio con extracto de malta (MYE) se duplica el crecimiento de los simbioses y la producción de ácido úsnico [21].

Los medios de cultivo suplementados con un exceso de fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, PEG) o nitrógeno (aminoácidos) desempeñan un papel importante para mejorar el crecimiento de los simbioses y la producción de sustancias líquénicas [10]. En los medios suplementados con fuentes de carbono (sacarosa o PEG) y fuentes de nitrógeno se produjo un mayor crecimiento de los simbioses y aumentó la producción de ácido úsnico. En los medios suplementados con glucosa, independientemente de sus concentraciones, se promovió el crecimiento de los simbioses después de cuatro meses de inoculación, pero no pudieron promover la producción del ácido úsnico incluso después de seis meses de inoculación. La glicina promovió el crecimiento de los simbioses, pero su tasa de crecimiento y producción de ácido úsnico fue más lenta. En los cultivos que crecieron en medios con asparagina y alanina no se promovió la producción del ácido úsnico (Figura 19) [21]

Estudios similares con *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Schaer mostraron que para la producción de metabolitos secundarios en el cultivo se necesitan medios de nutrientes relativamente ligeros, a baja temperatura y deshidratantes. En los cultivos de *Ramalina siliquosa* (Huds.) A.L. Sm. se observó una gran cantidad de producción de depsidos y depsidonas cuando el pH fue de 6,5 y la temperatura de incubación fue de 15-17°C [10].





**Figura 19.** Comparación del crecimiento de los simbiontes y la producción de ácido úsnico del líquen *Usnea ghattensis* en medios agua-agar y extracto de malta y levadura (MYE) complementados con fuentes de carbono y nitrógeno. Fuente: Behera et al. (2006) [21].

En general, los cultivos de líquenes *in vitro* crecen mucho más rápido que los líquenes en condiciones naturales, pero más lentamente que otros microorganismos. Las tasas de crecimiento deben mejorarse si se van a utilizar para la producción industrial de sustancias bioactivas. Se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar el crecimiento y la producción de metabolitos, pero aún no es suficiente para la explotación comercial de los metabolitos secundarios de los líquenes. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar la técnica de cultivo de talos liquénicos para comprender mejor sus aplicaciones en biotecnología y biomedicina. Además, el uso de biorreactores complementa el método de cultivo convencional para la producción en masa de metabolitos secundarios de líquenes en condiciones *in vitro* dentro de un lapso de tiempo menor. Esto podría ser útil para obtener buenas cantidades de biomasa cultivada y también puede ampliar considerablemente el acceso a los metabolitos del líquen hacia posibles aplicaciones en suplementos farmacéuticos [10].

## Conclusiones

Los líquenes producen metabolitos secundarios únicos que les permiten sobrevivir en condiciones extremas. Estos metabolitos constituyen una fuente natural de compuestos con un amplio espectro de actividades biológicas de importancia industrial. Trabajos recientes han mostrado que estos compuestos, de bajo peso molecular, son muy prometedores para aplicaciones biofarmacéuticas como antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, analgésicos, antioxidantes, antitumorales, etc. A pesar de ello, solo se ha estudiado un número muy limitado de líquenes quedando numerosas especies por investigar. En la actualidad, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial lo que lleva a un creciente interés por los líquenes por ser una fuente importante de moléculas con actividad antioxidante y antitumoral. La actividad antitumoral se debe a la capacidad para regular el ciclo celular, inducir la muerte celular apoptótica, modular el sistema inmune e inhibir la angiogénesis, entre otros. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que muestren actividad inhibidora contra la motilidad de las células cancerosas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de

identificar nuevos metabolitos de líquenes, ampliar los estudios de los compuestos que ya han mostrado una actividad prometedora contra varias líneas celulares de cáncer, realizar ensayos clínicos para aquellos compuestos que han mostrado una actividad significativa y lograr la producción industrial e implementar líneas de medicamentos eficaces. Uno de los principales problemas relacionados con el uso limitado de compuestos de líquenes en la medicina moderna está relacionado con su lenta tasa de crecimiento en la naturaleza y las dificultades para llevar a cabo el cultivo *in vitro*. Sin embargo, con los recientes avances en tecnología, el cultivo de líquenes en el laboratorio está logrando un mayor éxito, pero aún no son suficientes para la explotación comercial de sus metabolitos secundarios. Por lo tanto, existe también una necesidad de mejorar la técnica de cultivo de talos liquénicos para impulsar sus aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.

## Bibliografía

- [1] Cruz Hernández, J J y González Sarmiento, R. (2018). Biología celular y molecular del cáncer. En *Oncología clínica* (pp. 5-12). España: Elsevier.
- [2] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68, 394-424.
- [3] Kim, H., Kim, K. K., & Hur, J. S. (2015). Anticancer activity of lichen metabolites and their mechanisms at the molecular level. En *Recent Advances in Lichenology* (pp. 201-208). New Delhi: Springer.
- [4] Zambare, V. P., & Christopher, L. P. (2012). Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50, 778-798.
- [5] Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P. K., Crespo, A., & Gómez-Serranillos, M. P. (2016). Evaluation of the antioxidant capacities and cytotoxic effects of ten Parmeliaceae lichen species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- [6] H. Nash III, T. (2008). Introduction. En *Lichen biology* (pp. 1-8). 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- [7] Ranković, B., & Kosanić, M. (2015). Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. En *Lichen Secondary Metabolites* (pp. 1-26). Cham: Springer, International Publishing.
- [8] Büdel, B., & Scheidegger, C. (1996). Thallus morphology and anatomy. *Lichen biology*, 2, 40-68.

- [9] Varol, M. (2018). Lichens as a Promising Source of Unique and Functional Small Molecules for Human Health and Well-Being. En *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 60, pp. 425-458). Mugla: Elsevier.
- [10] Verma, N., & Behera, B. C. (2015). In vitro culture of lichen partners: Need and implications. En *Recent Advances in Lichenology* (pp. 147-159). New Delhi: Springer.
- [11] Elix J. A. & Stocker-Wörgötter E. (2008). Biochemistry and secondary metabolites. En *Lichen biology* (pp. 104-134). 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- [12] Molnár, K., & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65, 157-173.
- [13] Basnet, B. B., Liu, H., Liu, L., & Suleimen, Y. M. (2018). Diversity of Anticancer and Antimicrobial Compounds from Lichens and Lichen-derived Fungi: A Systematic Review (1985-2017). *Current Organic Chemistry*, 22, 2487-2500.
- [14] Shrestha, G., & Clair, L. L. S. (2013). Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry reviews*, 12, 229-244.
- [15] Goga, M., Elečko, J., Marcinčinová, M., Ručová, D., Bačkorová, M., & Bačkor, M. (2018). Lichen Metabolites: An Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 1-36.
- [16] Studzinska-Sroka, E., Galanty, A., & Bylka, W. (2017). Atranorin-an interesting lichen secondary metabolite. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17, 1633-1645.
- [17] Liu, Y., Yue, C., Li, J., Wu, J., Wang, S., Sun, D.,... & Wang, R. (2018). Enhancement of cisplatin cytotoxicity by Retigeric acid B involves blocking DNA repair and activating DR5 in prostate cancer cells. *Oncology letters*, 15, 2871-2880.
- [18] Goloudina, A. R., Demidov, O. N., & Garrido, C. (2012). Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer letters*, 325, 117-124.
- [19] Cardile, V., Graziano, A. C. E., Avola, R., Piovano, M., & Russo, A. (2017). Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. *Chemico-biological interactions*, 263, 36-45.
- [20] Bogo, D., Matos, M. D. F. C., Honda, N. K., Pontes, E. C., Oguma, P. M., da Silva Santos, E. C., & Nomizo, A. (2010). In vitro antitumour activity of orsellinates. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65, 43-48.

- <sup>[21]</sup> Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., & Makhija, U. (2006). Experimental studies on the growth and usnic acid production in “lichen” *Usnea ghattensis* in vitro. *Microbiological research*, 161, 232-237.